

# **Trabalho de Conclusão de Curso**

## **ANÁLISE HISTOLÓGICA DA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA UTILIZANDO MEMBRANAS DE ÁCIDO POLILÁTICO CO-GLICÓLICO (PLGA) ASSOCIADO OU NÃO À HIDROXIAPATITA (PLGA+HA) EM DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS**

Christopher Rainier Santiago da Silva



**Universidade Federal de Santa Catarina  
Curso de Graduação em Odontologia**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

Christopher Rainier Santiago da Silva

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DA REGENERAÇÃO ÓSSEA  
GUIADA UTILIZANDO MEMBRANAS DE ÁCIDO  
POLILÁCTICO CO-GLICÓLICO (PLGA) ASSOCIADO OU NÃO  
À HIDROXIAPATITA (PLGA+HA) EM DEFECTOS ÓSSEOS  
CRÍTICOS**

Trabalho apresentado à Universidade  
Federal de Santa Catarina, como  
requisito para a conclusão do Curso de  
Graduação em Odontologia

Orientador: Dr. Prof. Dr. Ricardo de  
Souza Magini

Co-orientador: Ms. Artur Breno  
Wanderley Alécio

Florianópolis

2017

Christopher Rainier Santiago da Silva

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DA REGENERAÇÃO ÓSSEA  
GUIADA UTILIZANDO MEMBRANAS DE ÁCIDO  
POLILÁCTICO CO-GLICÓLICO (PLGA) ASSOCIADO OU NÃO  
À HIDROXIAPATITA (PLGA+HA) EM DEFEITOS ÓSSEOS  
CRÍTICOS**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado, adequado para obtenção do título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 17 de outubro de 2017.

**Banca Examinadora:**

---

Prof., Dr. Ricardo de Souza Magini,  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup>, Dr.<sup>a</sup> Ariadne Cristiane Cabral da Cruz,  
Membro  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

MSc. Suzéli Dias,  
Membro  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Dr. Águedo Aragones,  
Suplente

*A Elvira Maria Santiago,  
guerreira, amiga e mãe. Que  
esteve zelando por mim em  
todos os momentos. Não há  
como retribuir tudo que você  
fez por mim. Mas espero que ao  
menos, eu consiga lhe mostrar  
o quanto eu te amo. Você será  
sempre o ser humano mais  
bonito desse mundo.*



## AGRADECIMENTOS

Este trabalho, além de sua importância científica, simboliza o fim de mais um ciclo em minha vida. Ciclo esse, que encerro com demasiada gratidão e esforço. Sem dúvidas, os momentos que vivi dentro da Universidade me engrandeceram como ser humano. Seria incapaz de atravessar essa etapa sem refletir por tudo que passei. As realizações, as alegrias, as amizades, as decepções, o medo e a angústia. Todos esses elementos construíram e lapidaram uma nova perspectiva de vida. Uma visão que reconhece que ainda há muito pela frente com relação ao meu futuro profissional, e que somente a educação pode nos revolucionar para fazer a diferença no mundo. Além de uma autoavaliação, seria injusto não reconhecer aqueles que fizeram de mim o profissional que sou hoje, por isso espero que saibam que sou extremamente grato a cada um de vocês e que os levarei comigo em meu coração.

Agradeço em primeiro lugar a **Universidade Federal de Santa Catarina**, por me promover um ensino de qualidade e de reconhecimento mundial. Pela oportunidade a mim conquistada, reconhecendo que infelizmente ainda pouquíssimos brasileiros têm acesso e condições a estar aqui. Prometo carregar os ensinamentos que tive nessa aclamada Universidade com toda responsabilidade que cabe a mim, e terei sempre muito orgulho em dizer que sou UFSC.

Ao meu orientador, Professor, Doutor **Ricardo de Souza Magini** por me conduzir neste trabalho e propiciar-me esta experiência. Além de um mestre ímpar, sempre ensinando e agregando mais que o conhecimento científico aos seus alunos, um verdadeiro amigo! Espero lhe trazer algum orgulho com este trabalho.

À minha mãe, **Elvira Maria Santiago**, que me criou, protegeu e me permitiu sempre sonhar o mais alto possível. A senhora sempre esteve lá por mim, e eu sou eternamente grato pelo seu amor incondicional. Obrigada, nunca será o suficiente para você, eu te amo minha guerreira.

A meu pai, **Lauro da Silva**, que eu adoraria que estivesse contemplando esse momento comigo. Espero ter dado orgulho ao senhor com esta conquista, sei que seria um sonho realizado para você ver este momento. Existe um verso que diz: perder o pai na infância é sentir saudade não do que viveu, mas do que poderia ter vivido. Gostaria que você estivesse aqui comigo. Saudades eternas.

Ao meu irmão, **Deividi Rodrigo**, por ter feito o papel não só de irmão, mas também de pai. Me aconselhando nos momentos de dúvidas e estendendo sua mão quando eu mais precisava de apoio. Mesmo que sem saber, você sempre foi meu Norte. Me acompanhando, torcendo por mim e me guiando durante toda minha jornada. Mesmo que longe estiveres, saiba que seu lugar como “player 2” nunca será ocupado.

Ao meu irmão, **Edson Lauro**, por garantir minha trajetória educacional e ser o pilar dentro do nosso lar quando nossa família mais precisou. Sua força garantiu a minha formação, sou muito grato pelo que fez por nós e por tudo que abdicou da sua vida para nos ajudar. Querido irmão, obrigado!

A minha namorada, **Giovanna Queiroz**, por ser uma companheira maravilhosa e ter suportado todo este momento de tensão e ansiedade ao meu lado. Provas como esta, me mostram que ao seu lado é o meu lugar, e que sempre que precisares do meu amor, carinho e afago eu estarei aqui por você, em todos os momentos. Esse é apenas o começo de uma linda e empolgante trajetória que estamos prestes a vivenciar meu amor, de janeiro a janeiro.

Aos irmãos e amigos que fiz durante esses cinco anos, **Alfonso, Vinicius, Junior, Matheus, Taina, Virginia, Nicolle**. Não há como falar de vocês sem me emocionar. Vocês fizeram parte de um dos capítulos mais incríveis da minha história até aqui. Não preciso dizer que nunca esquecerei de vocês, pois sei que no futuro estarão ao meu lado, de alguma forma. Foi uma honra senhores!

As pessoas que foram mais do que essenciais, **Artur e Suzéli Dias**. Sem vocês esta pesquisa não poderia ter sido concluída. A palavra de ordem desse trabalho é gratidão. Saibam que vocês já são profissionais incríveis, e serão

mestres ainda melhores. O sucesso já bate à porta de vocês, e eu estarei aqui torcendo e guiando meus passos sempre objetivando alcançá-los. Muito obrigado.

Um agradecimento especial a, **Maria Clara**, por me permitir conhecer a pessoa incrível que és. Me ensinou diversas lições que eu levarei para a vida toda. Querida “MC”, saiba que um quebra-cabeça não é montado com peças iguais. Assim fomos um para o outro nesses anos, diferentes um do outro e ao mesmo tempo formadores um do outro. E dessa forma você conseguiu me cativar. Você sabe que tenho um carinho especial por você, um amor de irmão. E irmão não se abandona, nem se esquece. Obrigado por tudo!!

Aos professores incríveis que me inspiraram nessa jornada, **Sylvio Monteiro, Daniela Carcereri, Vinicius Zendron, Helena, Liliane, Felipe Daltoé, Gerson Ribeiro, Nelson** e tantos outros. Os profissionais que vocês são, fazem com que esta escola seja mundialmente conhecida. Mas, as pessoas que vocês são, formam seres humanos melhores. Nunca percam essa essência, façam isso por um mundo melhor! Gratidão.

Ao **CAOQA**, que foi minha segunda casa enquanto estive na universidade. Espero que façam dessa instituição ainda mais gloriosa do que é hoje. Os estudantes juntos são mais fortes. E nós somos a prova de que é possível sim fazer ainda mais por uma educação de qualidade e respeito. Nunca esquecerei dos momentos incríveis que passei enquanto estive nesse local. Avante, sempre!

Ao projeto **Injeção Eletrônica** que me acompanhou em quase todo tempo de graduação, me mostrando que sonhar, nunca é demais. Me orgulha muito saber que tudo começou como um movimento estudantil e que já conseguimos beneficiar tantos alunos como o suor do nosso esforço. Vida longa, e que nossa mensagem possa ecoar por todo território nacional. Paz, amor, união e respeito.

Por fim, a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a formação da pessoa e profissional que sou hoje, a **13.1**, turma de excelência que



me acolheu. E a **12.2** que sempre estará guardada na minha memória pelos momentos incríveis compartilhados. Foi uma linda história até aqui, gratidão.



*“É mais fácil obter o que se deseja  
com um sorriso do que à ponta da  
espada.”*

***William Shakespeare***



## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vivo* o reparo ósseo utilizando membranas de poliácido láctico-co-glicólico (PLGA), associado ou não a hidroxiapatita (HA). Foram utilizados 13 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) adultos machos (20-24 semanas) pesando aproximadamente 180g. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: Controle negativo, no qual foram realizados os defeitos ósseos sem recobrimento com membrana; grupos PLGA e PLGA+HA, nos quais os defeitos ósseos foram recobertos com membrana de PLGA e PLGA+HA, respectivamente. Em cada animal foi realizado um defeito circular de 5mm de diâmetro em cada osso parietal. Os defeitos foram tratados aleatoriamente de acordo com os grupos propostos, totalizando 26 defeitos. As amostras foram coletadas após um período experimental de 30 dias, foram descalcificadas e, em seguida, processadas histologicamente. Em sequência foi realizada a análise morfométrica para avaliação do reparo ósseo. Após 30 dias observou-se formação óssea em todos os grupos do estudo. O grupo PLGA+HA apresentou uma média de área de  $1805,2357 \pm$  e um desvio padrão de 1394,93481, enquanto que o grupo PLGA apresentou uma média de  $2396,6143 \pm$  com um desvio padrão de 878,75394. Não foi possível estabelecer significância no processo de neoformação óssea entre os grupos da pesquisa ( $p > 0,05$ ). Uma amostra mais representativa poderá revelar ou não o efeito osteopromotor associado a HA, assim como a associação com uma análise imunohistoquímica de marcadores da formação óssea.

**Palavras-Chave:** Regeneração óssea; Membranas; Hidroxiapatita; Polímeros.



## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate *in vivo* bone repair using a polylactic acid membrane-co-glycolic acid (PLGA), associated with hydroxyapatite (HA). Thirteen (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) adult males (20-24 weeks) rats weighing approximately 180g were used. The animals were divided into 3 groups: Control group in which the bone defects were realized without covering membrane; PLGA and PLGA + HA groups in which the bone defects were covered with a membrane of PLGA and PLGA + HA, respectively. In each animal a circular diameter 5mm in each parietal bone defect was made. The defects were randomly treated according to the proposed groups, totaling 26 defects. The samples were collected after a trial period of 30 days, decalcified and were followed for histological processing. Sequentially morphometric analysis was performed for evaluation of bone repair. After a period of 30 days bone formation in all study groups was observed. The PLGA + HA group had a mean area of  $1805,2357 \pm$  and a standard deviation of 1394,93481, while the PLGA group presented  $2396,6143 \pm$  an average standard deviation with a 878,75394. Unable to establish the significance of bone formation process among groups in this research ( $p > 0,05$ ). A representative sample can reveal whether or not the bone promoter effect is associated with HA, well as the association with an immunohistochemical analysis of markers of bone formation.

**Keywords:** Bone repair; Membranes; Hydroxyapatite. Polymers.





## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Reação de hidrólise do PLGA.....	35
<b>Figura 2</b> - Intervenção cirúrgica, experimental e coleta das amostras.....	41
<b>Figura 3</b> - Digitalizador de lâminas Axio Scan e Software ZEN Blue.....	45
<b>Figura 4</b> - Programa de processamento de imagem – IMAGEJ.....	46



## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> – Comparação da área em pixels entre os grupos PLGA+HA, PLGA após o período de 30 dias.....	49
--	----



## **LISTA DE LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**PTFE** - Politetrafluoretileno

**ROG** - Regeneração óssea guiada

**HA** - Hidroxiapatita

**PGA** - Poliglicólico

**PLA** - Polilático

**PLGA** - Ácido poli lático-co-glicólico

**PLGA+HA** - Ácido poli lático-co-glicólico associada à hidroxiapatita

**H&E** - Hematoxilina & Eosina

**e-PTFE** - Politetrafluoretileno expandido

**d-PTFE** - Politetrafluoretileno de elevada densidade

**EDTA** - Àcido etilenodiamino tetra-acético

**GL** - °Gay Lusac

**USA** - United States of America

**SPSS** - Statistical Package for the Social Sciences



## LISTA DE SÍMBOLOS

**%** - Por cento

**H<sup>+</sup>** - Cátion

**g** – Gramas

**°C** - Graus Celcius

**+** - Mais

**-** - Menos

**h** – Hora

**mm** – Milímetro

**ChCl<sub>3</sub>** – Clorofórmio

**m /v** - Massa dividida pelo volume

**µm** – Micrômetro

**α** – Alfa

**γ** - Gama

**mg** – Miligrama

**Kg** – Quilograma

**rpm** - Rotações por minuto

**ph** - Potencial hidrogeniônico





## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>30</b>
2.1 Regeneração Óssea Guiada.....	30
2.2 Membranas Não Reabsorvíveis.....	31
2.3 Membranas Bioreabsorvíveis .....	32
2.3.1 Membranas de colágeno.....	32
2.3.2 Membranas poliméricas .....	34
2.4 Biomateriais incorporados a membrana .....	36
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
3.1 Objetivo Geral.....	38
3.2 Objetivos Específicos.....	38
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>39</b>
4.1 Delineamento do Estudo.....	39
4.2 Aspectos Éticos e Legais .....	39
4.3 Seleção da Amostra.....	39
4.4 Obtenção e Preparo das Membranas de PLGA+HA .....	40
4.5 Intervenção Cirúrgica.....	40
4.6 Coleta das Amostras.....	43
4.7 Processamento Histotécnico das Amostras .....	43
4.8 Análise Morfométrica.....	45
4.9 Análise Estatística.....	46
<b>5. RESULTADO.....</b>	<b>47</b>
5.1 Análise Histológica Descritiva.....	47
5.2 Quantificação da Área de Neoformação Óssea .....	48
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>
ANEXO A.....	62
<u>ANEXO B.....</u>	<u>63</u>



## 1 INTRODUÇÃO

O aumento da instalação de implantes dentários em pacientes edêntulos ou parcialmente edêntulos se deu devido ao advento da osteointegração e os avanços das técnicas e biomaterias disponíveis. (MCALLISTER; HAGHIGHAT, 2007). A colocação de implantes ósseo integrados depende de vários fatores, um deles é uma quantidade óssea suficiente, que nem sempre se encontra nos maxilares (CHIAPASCO ET AL., 2009).

Um dos maiores desafios para os cirurgiões dentistas, com relação a colocação de implantes, é a reconstrução de grandes defeitos ósseos, sejam eles causados por infecções, traumas, ressecções provenientes de tumores, ou anomalias. (BOSCH C, MELSEN B, VARGERVIK K, 1998). Esse desafio se dá em consequência da formação acelerada de tecido conjuntivo denso, quando comparado a osteogênese. (MELCHER 1976). Por isso a migração celular seletiva se faz necessária na regeneração óssea guiada, excluindo células como fibroblastos em regiões de cicatrização (NYLMAN et al., 1982).

Estudos como o de Caffesse et al. (1988) e Caffesse et al. (1990), visando regenerar tecidos periodontais perdidos, mostraram a possibilidade de selecionar células de determinados tecidos e impedir que células de tecidos não desejáveis repovoassem uma ferida. Para isso, fazendo o uso de membranas. Esse mesmo conceito se mostrou aplicável na técnica da Regeneração Óssea Guiada e na atualidade sabe-se que o uso de membranas como barreira tecidual é comprovadamente eficiente com relação a invasão dos tecidos moles e favorece o

crescimento de tecido ósseo na região perdida. (DAHLIN et al.,1988; SALONEN & PERSSON 1990).

Além de características como: permeabilidade seletiva, degradação controlada, biocompatibilidade, estabilidade dimensional e facilidade para manuseio cirúrgico, que são propriedades necessárias para as membranas usadas nas técnicas de reconstrução (RETZEPI; DONOS, 2010). Dentre as membranas disponíveis no mercado para a Regeneração Óssea Guiada (ROG) estão as membranas absorvíveis e as não reabsorvíveis. Sendo elas de origem animal ou sintéticas, como os polímeros. Dentre as membranas reabsorvíveis mais comumente usadas se insere as membranas de colágeno de origem animal, pois apresentam características como facilidade de manipulação, hemostasia e imunogenicidade (HUTMACHER; HÜRZELER; SCHLIEPHAKE, 1996).

No entanto, devido a sua baixa estabilidade dimensional e rápida absorção através das vias de degradação enzimática (HUTMACHER; HÜRZELER; SCHLIEPHAKE, 1996; TATAKIS; PROMSUDTHI; WIKESJÖ, 1999; ROTHAMEL et al., 2004) as membranas reabsorvíveis, derivadas de polímeros, começam a se posicionar como uma alternativa ao problema citado. Entre esses polímeros, a literatura mostrou progresso nas pesquisas realizadas com ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA) e seus copolímeros (PLGA) (KIREMITÇI; DENIZ, 1999). Além disso, vários biomateriais têm sido incorporados às membranas sintéticas, visando melhorar suas propriedades e consequentemente acelerar o reparo ósseo (OWEN ET AL.,2010; CHEN ET AL.,2012; REIS ET AL.,2011).

Um desses materiais pesquisados é a hidroxiapatita (HA). O constituinte mineral do osso natural, representando 30 a 70% da massa dos ossos e dentes (DORAIRAJAN, 2005). A hidroxiapatita sintética é uma cerâmica biocompatível que tem afinidade com o tecido ósseo, o que favorece a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas, além de possuir propriedades de osseointegração. A porosidade desse material facilita a proliferação do tecido ósseo (ISHIHARA, 1992) porém, diminui a resistência do material (LOPES, 1999). Desta forma, a associação entre um material resistente como o PLGA com outro que possui afinidade com os tecidos (hidroxiapatita), poderia melhorar e acelerar reparo ósseo e, conseqüentemente, o tratamento de pacientes com pde ganho ósseo.

O objetivo deste estudo é avaliar e comparar, *in vivo*, a morfologia e morfometria tecidual do reparo ósseo utilizando membranas de ácido polilático co-glicólico (PLGA) associado ou não à hidroxiapatita (HA) em regenerações ósseas guiadas.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Regeneração Óssea Guiada

Através das bases biológicas sedimentadas por Caffesse et al. (1988) e Caffesse et al. (1990) com relação a Regeneração Tecidual Guiada, a ROG teve como precursor os estudos de Dahlin et al. (1988) que submeteram um grupo de ratos a defeitos cirúrgicos em suas mandíbulas e obtiveram regeneração óssea através da utilização de uma membrana de Teflon que atuou como uma barreira física.

A utilização de Membranas é essencial para a exclusão celular seletiva, necessária para regeneração óssea de defeitos ósseos. Em cirurgias, para a colocação de enxertos ósseos, essa barreira física é utilizada para recobrir todo o material ósseo e impedir que células epiteliais de tecido conjuntivo mole invadam os defeitos. Com a colocação da membrana sobre o enxerto e o reposicionamento do perióstio sobre a área externa, é possível garantir que apenas células capazes de depositar nova matriz óssea possam migrar para a área desejada (BUSER, 2010)

Com o alicerce da ROG, diversos estudos já mostraram eficácia no aumento de volume ósseo para colocação de implantes dentários. Tanto de maneira vertical, como horizontal. Que posteriormente, serviram como aporte ósseo, tanto para implantes imediatos, ou não. (CHIAPASCO; ZANIBONI, 2009; ESPOSITO et al., 2006; MAYFIELD et al. 1998; BUSER et al., 1995; NYMAN, 1990).

## **2.2 Membranas Não Reabsorvíveis**

Na prática odontológica dos anos 80 e início dos 90, a ROG e RTG tinham como padrão o uso das membranas de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) graças a estudos que demonstraram maior eficiência e rapidez na cicatrização óssea quando esta barreira física era utilizada (DAHLIN et al., 1990; NYMAN et al., 1991).

O PTFE se apresenta como um material não biodegradável e biologicamente inerte. Sendo este, um fluoropolímero sintético dependente de uma forte união entre moléculas de carbono e flúor. Além da membrana de e-PTFE, existem outras barreiras físicas não reabsorvíveis: 1) Membranas de politetrafluoretileno de elevada densidade (d-PTFE) e 2) Membranas de e-PTFE reforçadas por titânio. Diversas pesquisas já comprovaram resultados satisfatórios quando essas membranas são associadas à ROG. Dentre suas características, se enaltece sua ótima biocompatibilidade e sua inerência, por não provocar reações imunológicas exacerbadas. Propiciam também manutenção de um espaço adequado para acomodação do coágulo e estabilidade (BUSER, 2010).

Apesar dos estudos clínicos e experimentais terem mostrado extrema eficácia e resultados estáveis quando estas barreiras estão associadas a procedimentos como a RTG e ROG, deiscências e complicações durante a cicatrização das feridas estão correlacionadas a eles. Outra importante desvantagem com relação a essas membranas é a necessidade de uma segunda etapa cirúrgica para sua remoção. Além de envolver riscos como a de uma perda de parte do osso regenerado, é um procedimento que envolve desconforto e custo adicional ao paciente. (BUSER, 2010)

## **2.3 Membranas Bioreabsorvíveis**

Tendo em vista o risco de exposição prematura e a necessidade de uma segunda etapa cirúrgica para a remoção de membranas não reabsorvíveis, pesquisadores tem dado prioridade ao estudo e uso clínico das membranas reabsorvíveis nos procedimentos de ROG. Existem ainda algumas outras vantagens, como: um procedimento cirúrgico simplificado com o sistema de implante numa abordagem em dois estágios; variabilidade maior de técnica cirúrgica na conexão do pilar, coincidente com a remoção da membrana no sistema bioinerte; maior custo-efetividade e menor morbidade para o paciente (BUSER 2010).

Atualmente, dois tipos de materiais são usados na confecção das membranas reabsorvíveis e tem seu uso clínico devidamente comprovado, são eles: Os poliésteres sintéticos alifáticos e o colágeno derivado de origem animal, geralmente do tipo I e III. Apesar de apresentarem efeitos biológicos distintos, ambos possuem importante significado clínico por apresentarem longevidade da sua função como barreira e biocompatibilidade. (AABOE et al., 2000)

### **2.3.1 Membranas de colágeno**

Por volta dos anos 90 iniciaram-se as pesquisas com relação a barreiras alternativas que pudessem substituir e resolver o problema de exposição e infecção das membranas não reabsorvíveis (e-PTFEs). Após anos de estudos clínicos e experimentais começou se o uso de membranas reabsorvíveis, especialmente com as membranas de colágeno (VON ARX e BUSER 2006).



As membranas de colágeno comercialmente disponíveis são feitas a partir do colágeno tipo I ou de uma combinação entre colágeno II e III. Que provem de fontes como tendão e derme de bovinos e suínos (BUSER 2010). Dentre as propriedades das membranas de colágeno podemos citar: maleabilidade, manipulação facilitada, função hemostática, facilidade de estabilização, semi-permeabilidade, além de serem adaptáveis. Outra característica crucial dessa barreira é a degradação enzimática e o potencial de atração química de fibroblastos para as áreas onde há reação inflamatória. Nesse processo as fibras colágenas são clivadas pelas collagenases, assim, a digestão dos produtos da desnaturação forma condições propícias para a ação de proteases não específicas sugerindo que elas sejam as responsáveis pela migração dos fibroblastos para os sítios de inflamação (POSTLETHWAITE, 1978).

Apesar de serem biocompatíveis, as membranas de colágeno possuem propriedades mecânicas desfavoráveis e atuam de forma ineficiente como barreira devido biodegradação rápida pelas atividades enzimáticas dos macrófagos e leucócitos polimorfonucleares. (BUSER 2010).

Outro fator negativo seria a ausência de propriedade mantenedora de espaço. Por isso, no seu uso clínico, ela sempre deverá ser associada ao uso de enxertos. (HOCKERS et al, 1999; NOTICE et al, 2001 a, b; TAGA, 2004). E, mesmo quando o enxerto é concomitantemente utilizado, sempre é reportado certo grau de reabsorção (BUSER, 2006).

Contudo, no intuito de proporcionar um maior tempo de ação como barreira mecânica, foram desenvolvidas membranas colágenas através de tecnologia de ligação cruzada, utilizando radiação

ultravioleta, hexametileno diisocianato e glutaraldeído. Sendo que a técnica com glutaraldeído é a mais amplamente utilizada e se mostrou eficiente na viabilização de um maior tempo de permanência dessa membrana no sítio proposto, mas infelizmente deixando resíduos citotóxicos no processo (BUNYARAT AVEJ & WANG, 2001).

### **2.3.2 Membranas poliméricas**

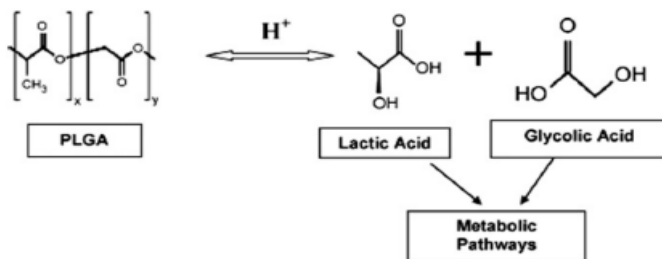
Existem diversos poliésteres sintéticos que são usados como membranas atualmente. Estes materiais podem ser reproduzidos sob condições estritamente controladas e disponíveis em quantidades ilimitadas, o que por si só, já se caracteriza como uma grande vantagem em relação as barreiras de colágeno. Os tipos de polímeros bioreabsorvíveis em destaque usados para a produção dessas membranas são: ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA) e seus copolímeros, o ácido polilático co-glicólico (PLGA) (KIREMITÇI; DENIZ, 1999; BUSER 2010).

Os polímeros derivados do PLA possuem vantagens como o comportamento termoplástico, alta resistência, biocompatibilidade e uma degradação lenta (1 a 2 anos). Já os polímeros derivados do PGA se destacam pela boa propriedade mecânica. No entanto, possuem a desvantagem de sofrerem rápida absorção pelo organismo. (FILHO ET AL., 2006)

Em consequência dos resultados obtidos com as barreiras de PGA e PLA, a combinação de polímeros demonstrou um potencial interessante para obtenção de um material com as propriedades desejáveis. Por possuir particularidades químicas e físicas, as quais os polímeros individualmente não possuem, a membrana de PLGA

apresenta flexibilidade e requer um menor tempo para sua completa degradação, implicando em uma menor probabilidade de reações adversas (diferentes de outros polímeros que possuem um tempo de degradação muito longo e podem liberar fragmentos cristalinos). (PARK ET AL., 1992).

O tempo de degradação do PLGA se deve a sua cadeia polimérica, onde existe o mero proveniente do ácido glicólico que garante um maior ataque das moléculas de água. Fazendo assim, com que a sua estrutura química seja mais suscetível a reação de hidrólise, quando comparado ao PLLA, por exemplo (FILHO et al., 2006). Resultantes de sua degradação, o ácido lático e o ácido glicólico (Figura 1) são degradados durante o ciclo de Krebs e eliminados em forma de dióxido de carbono e água através do metabolismo. (OWEN et al., 2005)



**Figura 1** – Reação de hidrólise do PLGA

Fonte: Danhier, 2012.

Além de todas as propriedades citadas, as membranas de PLGA possuem bioatividade, e permitem a incorporação de substâncias importantes, que podem trazer benefícios a regeneração óssea guiada e a

manutenção dos tecidos, como: anti-inflamatórios, imunoestimulantes e antimicrobianos, com liberação local e controlada. (OWEN et al., 2010; CHEN et al., 2012).

#### **2.4 Biomateriais incorporados a membrana**

Os biomateriais têm sido incorporados às membranas sintéticas, na tentativa de solucionar e melhorar algumas das suas propriedades, como por exemplo: acelerar o reparo ósseo (OWEN ET AL., 2010; CHEN ET AL., 2012; REIS ET AL., 2011).

. Precusores nesses estudos, Sui et al., 1997, analisaram *in vitro*, as propriedades da HA associada à membrana de PLLA e observaram uma maior adesão de osteoblastos à superfície das membranas que foram associadas à hidroxiapatita quando comparadas com as membranas de PLLA isoladas. Desta forma, a hidroxiapatita poderia ter o mesmo efeito na associação com as membranas de PLGA.

Messias et al (2008) realizaram um estudo *in vitro* com células da calvária de ratos e observou que arcabouços de PLGA associados à hidroxiapatita possibilitam um aumento na síntese de colágeno, bem como um melhor comportamento dos osteoblastos quando comparados com arcabouços de PLGA sem hidroxiapatita. Neste estudo, mesmo sem diferença significativa entre os grupos tratados com membranas, os grupos que foram tratados com membranas de PLGA+HA mostraram valores de escala de cinza maiores que os receberam apenas membranas de PLGA.

Tai et al (2013) realizou um estudo *in vivo* com ratos e também concluiu em seu estudo que microesferas de PLGA em associação com Hidroxiapatita e sinvastatina em defeitos ósseos facilitam a regeneração

óssea. E sugeriram que este material deve ser usado com um arcabouço osteocondutor para tratar defeitos ósseos graves.

Ferreira (2014) realizou um estudo *in vivo* impregnando PLGA [poli (ácido láctico-co-glicólico)] com Sinvastatina em defeitos ósseos, criados em osso parietal de 3 grupos de ratos (1 grupo com membrana de PLGA recobrindo o defeito, 1 grupo com microesferas de PLGA contendo sinvastatina dentro da ferida e recoberta por membrana de PLGA, 1 grupo apenas com microesferas de PLGA no defeito), no grupo controle deixou-se apenas o coágulo sanguíneo. Os animais foram sacrificados em dois períodos, 30 e 60 dias. Após coleta das amostras e análise morfológica em microscopia de luz, observou-se uma regeneração de tecido ósseo mais rápida em todos os grupos, quando comparado ao controle. Sendo o grupo com sinvastatina o mais veloz e com uma disposição da matriz neoformada mais organizada.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar *in vivo* o reparo ósseo e o potencial osteopromotor de membranas de ácido polilático-co-glicólico (PLGA) associado ou não a hidroxiapatita (HA).

#### **3.2 Objetivos Específicos**

1. Analisar comparativamente, em cortes histológicos corados com Hematoxilina-eosina, a morfometria tecidual do reparo ósseo dos defeitos associados ou não às membranas de PLGA e PLGA + HA, no período de 30 dias.

2. Realizar uma análise descritiva dos achados histológicos de cada grupo e compará-las.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Delineamento do Estudo**

O Estudo executado é do tipo experimental em laboratório.

### **4.2 Aspectos Éticos e Legais**

Para realização e consolidação do projeto, o mesmo foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais da referida Universidade, sob o protocolo PP00831 (Anexo A).

### **4.3 Seleção da Amostra**

Foram utilizados 13 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) adultos machos (20 – 24 semanas) pesando aproximadamente 180g. Os animais foram submetidos a dieta sólida padrão e água. Foram mantidos em condições similares, em sala com 22°C +/- 2°C, 60% +/- 5% de umidade e em ciclo claro/escuro de 12/12h. Os experimentos iniciaram após um período de 3 dias de aclimação. Os animais foram distribuídos em 3 grupos: Sham, grupo no qual foram realizados os defeitos ósseos sem recobrimento com membrana; PLGA e PLGA+HA, grupos nos quais os defeitos ósseos foram recobertos com membrana de PLGA e PLGA+HA respectivamente. Na calota craniana de cada animal foi realizado um defeito circular de 5mm de diâmetro em cada osso parietal. O defeito foi tratado aleatoriamente de acordo com os grupos propostos, totalizando 26 defeitos. As amostras foram coletadas após um período de 30 dias.

#### **4.4 Obtenção e Preparo das Membranas de PLGA+HA**

As membranas foram produzidas com copolímero de poli ácido láctico-co-glicólico associado à hidroxiapatita (PLGA+HA), obtidos pela técnica de evaporação de solvente. O copolímero de poli ácido láctico-co-glicólico (PLGA) (Resomer, Evonik Ind., Essen - Alemanha), na proporção 82:18 (m:m), foi dissolvido em clorofórmio PA (ChCl3 – Synth – LabSynth, Diadema, Brasil) (10% m/v) em temperatura ambiente. Após a dissolução completa do polímero, foram adicionadas partículas de 50  $\mu$ m de hidroxiapatita (30% m/v) (Genphos Genius, Baumer, Mogi Mirim, Brasil). Essa solução foi vertida em moldes e, após a evaporação do solvente em temperatura ambiente, as peças foram recortadas com uma tesoura para obtenção das amostras com dimensões de 15 x 20 x 0,5mm para recobrimento do defeito ósseo criado na calvária dos ratos. Depois de prontas, as amostras foram embaladas e submetidas à esterilização com radiação  $\gamma$ .

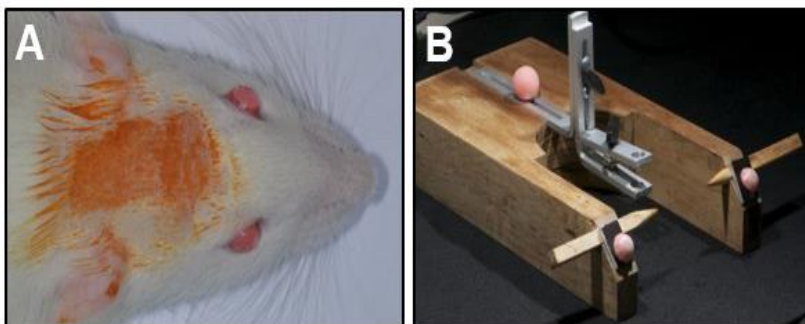
#### **4.5 Intervenção Cirúrgica**

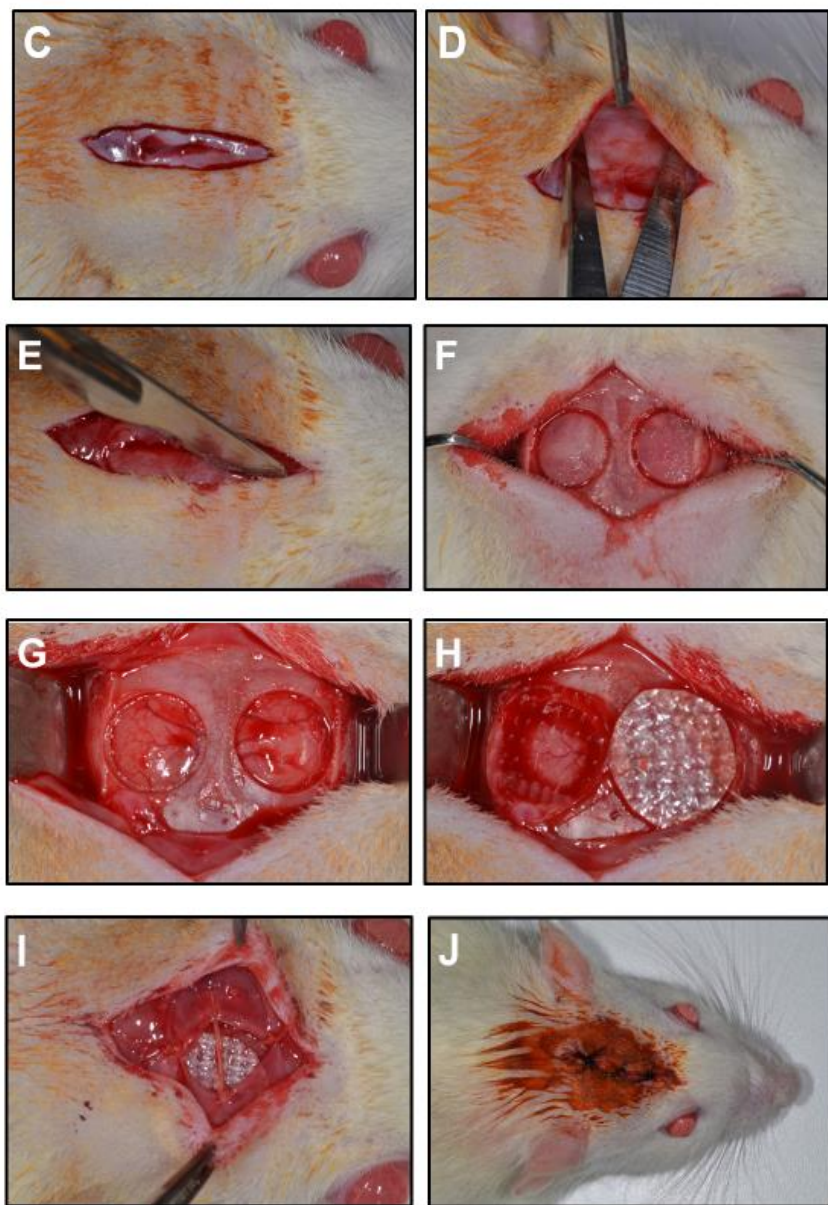
Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma combinação de 90mg/kg de cloridrato de cetamina 10% (Cetamin, Syntec, Cotia – São Paulo) e 10mg/kg cloridrato de xilazina 2% (Xilazin, Syntec, Cotia – São Paulo). A parte dorsal do crânio foi tricotomizada, e então realizada a antisepsia com algodão embebido em solução de iodopovidine (Povidine, Johnson & Johnson, São José dos Campos, São Paulo) (Figura 2-A), com o animal posicionado sobre a mesa cirúrgica em decúbito ventral e com a cabeça imobilizada em três pontos fixos com o auxílio de uma mesa para estereotaxia (Figura 2-B).

Uma incisão cutânea e muscular de 15 a 20mm de comprimento foi realizada na porção posterior da calvária ao longo da sutura sagital,



utilizando um cabo de bisturi nº 3 e lâmina nº 15 (Swann-Morton® SurgicalBlades, Inglaterra) (Figura 2-C). A pele e o tecido subcutâneo foram refletidos e, em seguida, os tecidos subjacentes divulsionados com o auxílio de uma tesoura pequena com extremidade romba e pinça de dissecação até a exposição do periósteo (Figura 2-D), que foi incisado permitindo a exposição do osso parietal (Figura 2-E). Dois defeitos ósseos foram realizados, um em cada osso parietal, laterais à sutura sagital (lado direito e lado esquerdo). Os defeitos foram realizados com o auxílio de uma broca trefina de 5mm de diâmetro (Neodent®, Curitiba - Paraná) montada em um motor cirúrgico (NSK®, Kanumashi - Japão) com contra-ângulo (NSK®, Kanumashi - Japão) apresentando redução de 20:1 e rotação de 1000rpm, sob irrigação constante com solução salina para prevenir o superaquecimento das paredes ósseas. Esse procedimento foi realizado delicadamente para evitar a exposição da dura-máter (Figuras 2-F, 2-G). Cada animal foi incluído em dois dos três grupos da amostra, ou seja, cada defeito foi regenerado aleatoriamente de acordo com um dos tipos de tratamento proposto (Figuras 2-H). O periósteo e o tecido subcutâneo foram reposicionados e suturados com fio de sutura Vicril 5.0 (Ethicon, Johnson & Johnson Company, SP, Brasil) e o tecido cutâneo com fio Nylon 5.0 (Ethicon, Johnson & Johnson Company, SP, Brasil) (Figuras 2-I, 2-J). Os animais foram monitorados diariamente.





**Figura 2** - Intervenção cirúrgica, experimental e coleta das amostras

**A** – Mesa utilizada para estereotaxia; **B** – Preparação asséptica pré-cirúrgica da área com Iodo-Polvinide; **C** – Incisão cutânea; **D** – Divulsão dos tecidos; **E** – Incisão periosteal; **F** – Defeitos realizados nos ossos parietais com a broca trefina de 5 mm de diâmetro; **G** – Tecidos ósseos do interior da trefina removidos pode-se observar vasos sanguíneos e exposição da dura-máter pelo defeito ósseo; **H** – Membranas de PLGA (esquerda) e PLGA+HA (direita) posicionadas sobre o defeito; **I** – Sutura do periósteo e estabilização das membranas; **J** – Sutura cutânea;

#### **4.6 Coleta das Amostras**

Decorridos os 30 dias de pós-operatório, os animais foram anestesiados como detalhado previamente e receberam perfusão de solução salina a 0,9% seguida de solução de paraformaldeído a 4% (pH 7.4) através da aorta ascendente. O crânio foi dissecado e os ossos parietais removidos com os tecidos circundantes intactos.

#### **4.7 Processamento Histotécnico das Amostras**

As amostras destinadas à processamento histotécnico foram imersas em recipientes de vidro previamente identificados de acordo com seu grupo, contendo solução de formaldeído tamponado a 10% (SigmaAldrich), por 24h à temperatura ambiente. Após a conclusão da fixação, as amostras foram desmineralizadas em solução de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA). Durante o processo de desmineralização, as amostras foram avaliadas semanalmente por meio de soluções que identificam cálcio disperso na solução. Para isso, foram utilizadas soluções de oxalato de amônia 5% e hidróxido de

amônia, bem como igual quantidade da solução que esteve em contato com a amostra. As soluções foram misturadas e avaliadas após 30 minutos, onde foi observado se houve ou não turbidez da solução. O processo de descalcificação seguiu-se até que a solução se mostrou clarificada. Após a descalcificação completa, as amostras foram seccionadas transversalmente a sutura sagital mediana na região mediana do defeito realizado, e seguiram para o seguinte processamento histotécnico no laboratório da Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina:

**A. Desidratação** – As amostras foram submetidas a consecutivas trocas de álcool em crescentes graduações (álcool 70 ° GL, álcool 96° GL, álcool etílico absoluto) objetivando remover a água dos tecidos;

**B. Diafanização (ou clareamento) em Xilol** – As amostras foram embebidas em uma substância miscível com parafina;

**C. Impregnação pela Parafina Fundida a 60°C** – Onde vasos e espaços intercelulares e do interior da célula foram impregnados, tornando mais fácil a obtenção dos cortes ao micrótomo;

**D. Inclusão em Parafina** – Obtenção do bloco para serem realizados os cortes no micrótomo;

**E. Microtomia** – As seções histológicas foram microtomizadas com 5µm de espessura;

**F. Coloração em hematoxilina e eosina - H&E** – As lâminas foram em corantes acidofílico e basofílico respectivamente.

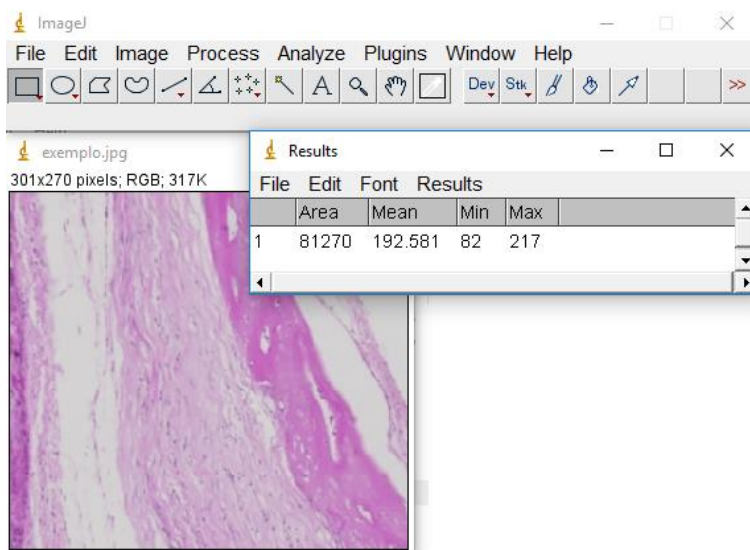
#### 4.8 Análise Morfométrica

As lâminas devidamente processadas e coradas por H&E foram submetidas a escaneamento através do digitalizador de lâminas Axio Scan.Z1 (Figura 3). Após a inserção das laminas no equipamento, através do software de visualização e análise de imagens ZEN Blue (Figura 3), foram realizados os ajustes de foco grosso e fino num aumento de até 40x percorrendo toda a extensão da lamina e selecionando todos os cortes desejados afim de observar o tecido ósseo formado e adjacente às áreas de reparo. Adquirida as imagens, as áreas de tecido ósseo neoformado foram mensuradas utilizando-se um Software para Processamento e Análise de Imagens (IMAGEJ) (Figura 4). Cada fotografia foi mensurada três vezes. Foi realizada uma média das três medidas de cada amostra que corresponde a área óssea neoformada em pixels. (Figura 4).



**Figura 3** – Digitalizador de lâminas Axio Scan e Software de visualização e análise de imagens ZEN Blue

Fonte: Zeiss.com



**Figura 4** – Programa de processamento de imagem - IMAGEJ.

Fonte: Adaptado de Image Processing and Analysis in Java, 2017

#### 4.9 Análise Estatística

Os dados referentes às medidas das neofomações foram tabulados no Excel® e exportados para o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS®) versão 20.0 para análise. Para testar a normalidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk e para verificar a normalidade das variâncias foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para verificar se existe diferença estatística significativa foi aplicado o TESTE-T, o nível de significância adotado foi  $\alpha < 0,05$ .

## **5. RESULTADO**

### **5.1 Análise Histológica Descritiva**

Nos cortes histológicos das amostras, coradas em H&E e seccionadas no sentido transversal dos defeitos cirúrgicos realizados, pode se observar, após um período de 30 dias, neoformação óssea em todos os grupos propostos. Sendo que nos grupos teste, foi possível observar a presença de tecido ósseo imaturo, caracterizado por uma quantidade significativa de osteócitos quando comparado ao grupo controle.

Nos defeitos realizados no grupo PLGA, as amostras apresentaram uma neoformação óssea abaixo da região onde foi instalada a membrana, criando uma lacuna de matriz óssea por toda sua extensão. Essa matriz, apresentou grande quantidade de células e diversas lacunas osteócitas. Em algumas regiões é notável a presença de fibras colágenas permeando as trabéculas ósseas, características de um osso imaturo. Além da presença de encapsulamento fibroso ao redor das membranas e novos vasos sanguíneos.

Em uma das amostras do grupo PLGA não houve nenhuma formação óssea, e também não apresentou remanescentes da membrana inserida. Houve apenas uma deposição de fibras colágenas sobre o defeito cirúrgico.

Outra amostra desse grupo apresentou tecido sobreposto e desarranjado entre si e teve que ser descartada por provável erro histotécnico.

No grupo PLGA+HA as características foram semelhantes ao grupo PLGA. No entanto em algumas das amostras desse grupo a

formação óssea não se deu de forma continua sobre as membranas, sendo possível observar uma porção não preenchida na região central, substituída por deposição de fibras colágenas.

Uma amostra do grupo PLGA+HA apresentou infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo, grande número de hemácias próximo a membrana e a presença de célula gigante multinucleada. O espaço da membrana apresentou rompimento e tecido ósseo ínfimo sobreposto. A amostra foi excluída da análise.

Em algumas amostras do grupo testes não pode ser observado remanescentes das membranas propostas no estudo. No grupo controle uma das amostras não apresentou neoformação óssea, apenas tecido fibroso sobre a região. Essa amostra foi excluída.

Devido ao número reduzido da amostra do grupo controle e a necessidade de exclusão de algumas laminas existentes, foi preciso deixar o grupo controle fora da comparação morfométrica.

Em todos os grupos de estudo foi possível observar osteoblastos na região periférica das trabéculas ósseas.

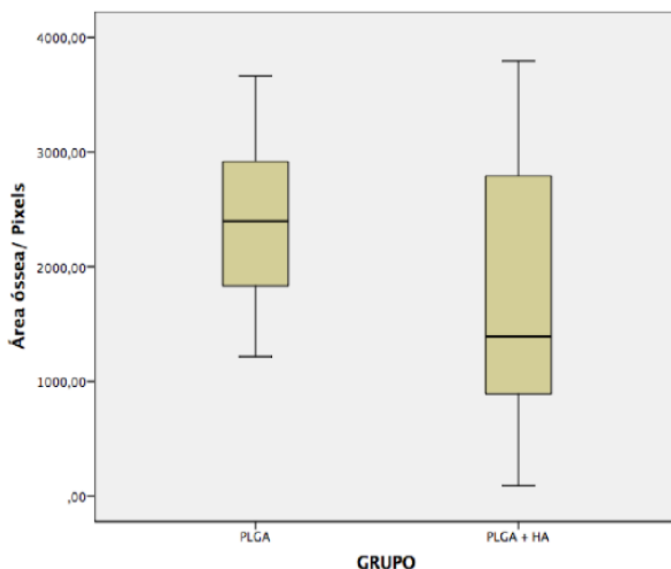
## **5.2 Quantificação da Área de Neoformação Óssea**

O teste de Shapiro-Wilk mostrou uma distribuição normal da amostra, para verificar a homogeneidade das variâncias, o teste de Kolmogorov-Smirnov foi aceito.

O grupo PLGA+HA apresentou uma média de área de  $1805,2357 \pm$  e um desvio padrão de 1394,93481, enquanto que o grupo PLGA apresentou uma média de 2396,6143 com um desvio padrão de 878,75394.



### Análise da morfometria da neoformação óssea em 30 dias



**Gráfico 1 - Comparação da área em pixels entre os grupos PLGA e PLGA+HA após o período de 30 dias. Não houve diferença estatística entre os grupos.**

O TESTE-T mostrou não existir essa diferença nas médias. O nível de significância adotado foi  $\alpha < 0,05$ . O Valor de p encontrado foi de 0,361

## 6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento tecnológico dos biomateriais, alicerçado ao conhecimento biológico acerca do tecido ósseo e sua formação, possibilitou a influência seletiva na formação óssea, controlando sua quantidade e qualidade no interior da estrutura oral. Desta forma membranas associadas as técnicas de regeneração óssea têm garantido, de forma previsível, uma reabilitação estética e funcional para colocação de implantes dentários. (CHIAPASCO et al., 2009).

Este estudo teve como interesse avaliar a neoformação óssea em defeitos realizados na calota craniana de ratos que foram posteriormente recobertos por membranas de PLGA e PLGA + HÁ, no período de 30 dias, a fim de conhecer seu potencial osteopromotor.

Segundo Sanches (2010), na área odontológica a Hidroxiapatita é uma biocerâmica aceita como osteocondutora e não osteoindutora.

Alguns autores como Carlo et al (2007) estudaram o efeito osteoindutor do biovidro (BV) e da hidroxiapatita sintética (HA) in vivo. Implantando biomateriais no tecido subcutâneo de cães. O material foi então processado para observação à microscopia óptica. Nas lâminas que continham a hidroxiapatita foram observados infiltrado celular intenso e reação inflamatória exsudativa inicial importante, que posteriormente se tornou granulomatosa. Nas lâminas dos animais com o biovidro, até os 30 dias, verificou-se infiltrado discreto, e aos 45 dias, predominava tecido fibroso. Como em nenhuma das lâminas houve formação ectópica de tecido ósseo, concluiu-se que os dois biomateriais não são osteoindutores.

Diferente da osteoindução, onde a formação de um novo tecido ósseo ocorre pela diferenciação local das células mesenquimais

indiferenciadas em osteoblastos sob a influência de agentes indutores, na osteocondução a função do biomaterial é promover um arcabouço para deposição de nova matriz óssea oriunda das imediações. Neste processo, existe crescimento e invasão de vaso sanguíneos, além de tecidos perivasculares e células indutoras de osso na área que recebe o enxerto. Posteriormente o biomaterial é gradativamente reabsorvido e substituído por um novo tecido ósseo (BAUER & MUSCHLER, 2000; CARVALHO et al., 2004; LINDHE et al., 2005).

Na pesquisa de MESSIAS et al (2009) investigaram-se o comportamento de células osteoblásticas da calvária de ratos em arcabouços porosos de compósitos de PLGA, PLGA/HA e grupo controle. As células foram submetidas à citotoxicidade e ao ensaio de adesão celular. Os resultados mostraram que o material não era citotóxico e a adesão celular melhorada com hidroxiapatita. As células osteoblásticas aderiram e se espalharam nos arcabouços, conforme observado. Após 14 dias, a presença de hidroxiapatita aumentou a síntese de colágeno comparado aos outros grupos. Sendo assim, os resultados demonstraram que ambos os arcabouços compósitos e poliméricos permitiram processos de adesão, espalhamento e síntese de colágeno pelas células osteoblásticas. Embora os andaimes PLGA/HA apresentassem melhores respostas celulares, tais como adesão celular e síntese de colágeno.

Desta forma, membranas de PLGA associadas à HA tem mostrado um bom efeito osteocondutor como sugerido.

Neste trabalho, barreiras de PLGA foram acrescidas de HA, e a diferença não foi estatisticamente significativa entre ambos os grupos testes, inclusive o grupo PLGA apresentou resultados ainda melhores.

Isso pode ter influência com a falta de padronização do comércio na produção de HA.

Algumas pesquisas tem mostrado uma falta de controle de qualidade sobre as especificações prometidas pelos fabricantes de marcas comercializadas no mercado brasileiro.

CONZ et al (2005), com o objetivo de caracterizar seis hidroxiapatitas granulares para aplicação em área médico-odontológica como material de enxerto, pesquisaram os parâmetros de cristalinidade, área superficial e composição. Propriedades que podem ser usadas para estimar a biodegradabilidade da hidroxiapatita e como critério de controle de qualidade desses materiais. Sendo o tamanho das partículas de extrema importância, pois afeta diretamente a superfície disponível para reagir com células e fluidos biológicos. Outro motivo para obter maior reabsorção pelo aumento da área superficial é produzir grânulos porosos. O diâmetro dos poros deve ser superior a 100 µm para o crescimento contínuo do osso. Além disso, a quantidade de osso novo formado é diretamente proporcional ao tamanho do poro. Os resultados mostraram que apenas um dos produtos teve a caracterização perfeitamente de acordo com a especificação do fabricante.

Sendo assim, é interessante ressaltar a necessidade urgente de desenvolvimento de um padrão brasileiro para este tipo de produto. A confiabilidade das profissões médicas e dentárias pode ser aumentada se esses padrões forem aprovados e o controle de qualidade for implementado, resultando, conseqüentemente, em um menor viés frente aos resultados de pesquisas que façam associação de outros materiais (como membranas reabsorvíveis) com esses produtos, assim como foi feito neste estudo.

Outra aspecto interessante que se deve levar em consideração no presente estudo é que não foi utilizado enxerto ósseo concomitantemente com essas membranas.

Estudos mostram que a associação com enxertos ósseos podem permitir uma maior formação óssea e garantir resultados tão satisfatórios quanto aqueles encontrados com a utilização das membranas de e-PTFE (BUSER 2010; HERCULANI et al., 2000).

Herculani et al. (2000) avaliou *in vivo* o reparo ósseo associado ao uso de membrana recobrimdo o coágulo e, associado a membrana um substituto ósseo preenchendo o defeito, observou-se que houve uma maior formação óssea no grupo em que foi associado ao uso da membrana algum substituto ósseo após um período de 6 meses.

Sendo assim pode-se supor que a utilização de substitutos ósseos para o preenchimento de defeitos ósseos junto com as membranas pode garantir uma das principais propriedades das barreiras utilizadas na ROG, que é a estabilização do coágulo. Evitando assim, que ocorra um possível colabamento da membrana ou que a membrana ocupe o espaço do coágulo, proporcionando uma menor formação óssea.

Acredita-se que as amostras que não apresentaram espaço referente as membranas ou apenas seus resquícios, tenham se movimentado durante o ato da sutura cirúrgica ou no período pós-operatório, ou possivelmente durante o processamento histotécnico, tendo em vista que o material passa por processo de agitação.

Em apenas uma lâmina foi observada célula gigante multinucleada e sinais de hemorragia, o que pode caracterizar uma consequência de lesão na dura-máter durante o ato cirúrgico. Tendo em vista que não foi possível observar processo inflamatório exacerbado em

outras amostras, sugerindo uma segurança em relação ao uso das membranas a base de PLGA, o que condiz com resultados satisfatórios obtidos em outros trabalhos realizados por outros autores (IGNATIUS & CLAES, 1996; MESSIAS ET AL., 2009).

## **7. CONCLUSÃO**

Não houve diferença estatística significativa na comparação entre os grupos PLGA E PLGA+HA. Uma amostra mais representativa, e/ou uma associação a análises imunohistoquímica de proteínas ósseas pode revelar o efeito osteopromotor da Hidroxiapatita incorporada à membrana de PLGA.

## REFERÊNCIAS

BRÅNEMARK, P. I; BREINE, U; ADELL, R; HANSSON, B. O; LINDSTRÖM, J. O. Intra-Osseous Anchorage of Dental Prostheses: I. Experimental Studies. **Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg**, v.3, n.2, p.81–100, Jan, 1969.

ADELL R; ERIKSSON, B; LEKHOLM, U; BRÅNEMARK, P. I; JEMT, T. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implant**, v.5, n.4, p.347–59, 1990.

LAMBRECHT, J. T; FILIPPI, A; KÜNZEL, A. R; SCHIEL, H. J. Longterm evaluation of submerged and nonsubmerged ITI solid-screw titanium implants: a 10-year life table analysis of 468 implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.18, n.6, p.826–34, Dec, 2003.

ARAÚJO, M. G; LINDHE, J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. **J Clin Periodontol**, v.32, n.2, p.212–8, Feb, 2005.

NYMAN, S; GOTTLOW, J; KARRING, T; LINDHE, J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. **Journal Clinical Periodontology**, v.9, n.3, p.257–65, Jun, 1982a.

MELCHER, A. H. On the repair potential of periodontal tissues. **Periodontal Repair**, v.47, n.5, p.256–60, May, 1976.

KARRING, T; NYMAN, S; LINDHE J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. **Journal Clinical Periodontology**, v.7, n.2, p.96–105, Apr, 1980.

NYMAN, S; LINDHE, J; KARRING, T; RYLANDER, H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. **Journal Clinical Periodontology**, v.9, n.4, p.290–6, Aug, 1982b.



DAHLIN, C; LINDE, A; GOTTLow, J; NYMAN, S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. **Plast Reconstr Surg**, v. 81, n.5, p.672-6, May, 1988.

DAHLIN, C; LINDE, A. Membrane-Introduced Bone Augmentation at Titanium Implants. A Report on Tem Fixtures Followed From 1 to 3 Years After Loading. v.11, n.4, p.273–81, 1991.

NYMAN S. NIKLAUS P. L; BUSER, D; BRÄGGER, U. Bone Regeneration Adjacent to Titanium Dental Implants Using Guided Tissue Regeneration: A Report of Two Cases. **JOMI**, p-9-14, Jan, 1990.

BUSER, D. 20 anos de Regeneração Óssea Guiada na Implantodontia. São Paulo: **Quintessence**; 276 p. 2010

JUNG, R. E; KOKOVIC, V; JURISIC, M; YAMAN, D; SUBRAMANI, K; WEBER, F. E. Guided bone regeneration with a synthetic biodegradable membrane: a comparative study in dogs. **Clin Oral Implants Res**, v.22, n.8, p.802–7, Aug, 2011.

JUNG, R. E; FENNER, N; HÄMMERLE, C. H. F; ZITZMANN, N. U; Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12-14 years. **Clin Oral Implants Res**, v.24, n.10, p.1065–73, Oct, 2013.

SCHNEIDER, D; WEBER, F. E; GRUNDER, U; ANDREONI, C; BURKHARDT, R; JUNG, R. E. A randomized controlled clinical multicenter trial comparing the clinical and histological performance of a new, modified polylactide-co-glycolide acid membrane to an expanded polytetrafluoroethylene membrane in guided bone regeneration procedures. **Clin Oral Implants Res**, v.25, n.2, p.150–8, Feb, 2014.

LEE, S. B; KWON, J. S; LEE, Y. K; KIM, K. M; KIM, K. N. Bioactivity and mechanical properties of collagen composite membranes reinforced by chitosan and  $\beta$ -tricalcium phosphate. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v.100, n.7, p.1935–42, Oct, 2012.

CHEN, G; XIA, Y; LU, X; ZHOU, X; ZHANG, F; GU, N. Effects of surface functionalization of PLGA membranes for guided bone regeneration on proliferation and behavior of osteoblasts. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.101A, n.1, p.44–53, Jan, 2013.

HAO, J; ACHARYA, A; CHEN, K; CHOU, J; KASUGAI, S; LANG, N. P. Novel bioresorbable strontium hydroxyapatite membrane for guided bone regeneration. **Clin Oral Implants Res**, Oct, 2013.

FILHO, H. N; JÚNIOR, L. C; NAGEM, H. D; FRANCISCONI, P. A. S. Scaffolds in tissue engineering bone. **Novations implant journal - biomaterials and esthetics**, v.01, n.01, p.54–62, Maio, 2006.

COSTA, A. C. F. M; LIMA M. G; LIMA, L. H. M. A; CORDEIRO V, V; VIANA, K. M. S; SOUZA, C. V; LIRA, H. L. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.4, n.3, p.29–38, 2009.

HÄMMERLE, C. H; JUNG, R. E; Bone augmentation by means of barrier membranes. **Periodontol** 2000, v.33, p.36-53, 2003.

DANHIER, F; ANSORENA, E; SILVA, J. M; COCO, R; LE BRETON, A; PRÉAT, V. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. **J Control Release**, v.161, n.2, p.505-22, Jul, 2012.

MURRAY, G; HOLDEN, R; ROSCHLAU, W. Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. **Am J Surg**, v.93, n.3, p.385–7, Mar, 1957.

BUSER, D; DULA, K; HESS, D; HIRT, H. P; BELSER, U. C. Localized ridge augmentation with autografts and barrier membranes. **Periodontol**, v.19, n.1, p.151–63, Feb, 1999.

HERMANN, J. S; BUSER, D. Guided bone regeneration for dental implants. *Curr Opin Periodontol*, v.3, p.168–77, 1996.

SCHROEDER, H. E. **The periodontium, Handbook of Microscopic Anatomy**, Berlin, v.5, p.233-313, 1986.

CHIAPASCO, M; CASENTINI, P; ZANIBONI, M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.24, p.237–59, 2009.

SIMION, M; JOVANOVIĆ, S. A; TINTI, C; BENFENATI, S. P. Longterm evaluation of osseointegrated implants inserted at the time or

after vertical ridge augmentation. A retrospective study on 123 implants with 1-5 year follow-up. **Clin Oral Implants Res**, v.12, n.1, p.35–45, Feb, 2001.

ROTHAMEL, D; SCHWARZ, F; SCULEAN, A; HERTEN, M; SCHERBAUM, W; BECKER J. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. **Clinical Oral Implants Research**, v.15, n.4, p.443–9, Aug, 2004.

OWEN, R. G; JACKSON, J. K; CHEHROUDI, B; BRUNETTE, M. D; BURT, M. H. An in vitro study of plasticized poly(lactic-co-glycolic acid)films as possible guided tissue regeneration membranes:Material properties and drug release kinetics. **Journal of Biomedical Materials Research Part**, v.95A, n.3, p.857–869, Dec, 2010.

NOTODIHARDJO, F. Z; KAKUDO, N; KUSHIDA, S; SUZUKI, K; KUSUMOTO, K. Bone regeneration with BMP-2 and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats. **J Cranio-Maxillofac Surg**, v.40, n.3, p.287–91, Apr, 2012.

IGNATIUS, A. A; CLAES, L. X. In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers: poly(P-L-lactide) and poly(L-lactide-coglycolide). **Biomaterials**, v 17, p.631-639, 1996.

POSTLETHWAITE A. E., SEYER J.M., KANG A. H. Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. **Proc. Natl. Sci. USA**. Vol 75 n.2 pp. 871-875, february 1978.

GWAN PARK, TAE & COHEN, SMADAR & LANGER, ROBERT. Poly(L-lactic acid)/Pluronic blends: characterization of phase separation behavior, degradation, and morphology and use as protein-releasing matrixes. **Macromolecules**. 25. 116-122. 1992.

WANG, Q. & WAN, C. Preparation and evaluation of a biomimetic scaffold with porosity gradients in vitro. **Anais Da Academia Brasileira de Ciencias**, 84(1), 9–16. 2012.

UDEREL, I.-U., DEN, G., PORTO, G. G., VASCONCELOS, B. C. do E., ANDRADE, E. S. de S., CARNEIRO, S. C. de A. S., ... Ott, S. M.

An in vitro study of plasticized poly(lactic-co-glycolic acid) films as possible guided tissue regeneration membranes: Material properties and drug release kinetics. **Key Engineering Materials**, 396–398(35), 153–161. 2010.

PORTO, G. G., VASCONCELOS, B. C. do E., ANDRADE, E. S. de S., CARNEIRO, S. C. de A. S., & FROTA, M. S. M. Is a 5 mm rat calvarium defect really critical? **Acta Cirurgica Brasileira**, 27(11), 757–760. 2012.

DUTRA MESSIAS, A., ARAGONES, A., & APARECIDA DE REZENDE DUEK, E. PLGA-Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Osteoblastic-Like Cells. **Key Engineering Materials**, 396–398, 461–464. 2009.

UDEREL, I.-U., & DEN, G. Synthesis, Characterization and in Vitro Degradation of Poly(DL-Lactide)/Poly(DL-Lactide-co-Glycolide) Films. **Turk J Chem**, 23, 153–161. 1999.

BILEZIKIAN, J. P., RAISZ, L. G., RODAN, G. A., & Ott, S. M. Histomorphometric Analysis of Bone Remodeling. **Principles of Bone Biology**, 303–XXIII. 2002.

OWEN, G. R., JACKSON, J., CHEHROUDI, B., BURT, H., & BRUNETTE, D. M. A PLGA membrane controlling cell behaviour for promoting tissue regeneration. **Biomaterials**, 26(35), 7447–7456. 2005.

CARLO, C., BORGES, B., PACHECO, A., REZENDE, D. F., MARIA, C., LOPES, C., DUARTE, S. Avaliação do efeito osteondutor da hidroxiapatita e do biovidro implantados em tecido subcutâneo de cão. **Revista Ceres**, 54(316), 492–500. 2007.

TAI, I.-C., FU, Y.-C., WANG, C.-K., CHANG, J.-K., & HO, M.-L. Local delivery of controlled-release simvastatin/PLGA/HAp microspheres enhances bone repair. **International Journal of Nanomedicine**, 8, 3895–904. 2013.

IDELANA, S. Bem-vindo Revista Periodontia Junho-2001. **Revista Periodontia**, 1–11. 2001.

FERREIRA, L. B. Estudo do processo de reparação óssea em defeitos na calvária de ratos utilizando sinvastatina associada a um polímero de poli (ácido láctico-co-glicólico). 2014.

GONÇALVES MENDONÇA, R. Avaliação Histológica do Processo de Reparo Ósseo Após Implantação de BMPs. **Pesquisa Brasileira Em Odontopediatria E Clínica Integrada**, 7(3), 291–296. 2007.

**ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa com Animais****Resultado de Solicitação de Protocolo****Protocolo**

PP00831

**Título**

Análise do padrão de regeneração óssea guiada, utilizando membranas de ácido polilático co-glicólico (PLGA) associado ou não à hidroxiapatita (PLGA + HA) em defeitos ósseos na calota craniana de ratos.

**Data de Entrada**

02/03/2013

**Resultado:**

Aprovado

**Data/Prazo**

16/08/2013

**Considerações**

Ofício nº 81/CEUA PROPEQ/2013

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Ricardo de Souza Magini, Departamento de Odontologia - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois anos, para a utilização de cinquenta ratos (*Rattus Norvegicus*).

- Procedência do animal: Biotério Central - UFSC

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 20/11/2013

Data 20/08/2013

Parecer(es):



Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC  
PRESIDENTE

## ANEXO B



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE ODONTOLOGIA  
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE ODONTOLOGIA

## ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos 17 dias do mês de OUTUBRO de 2017, às 17:45 horas,  
em sessão pública no (a) CCS Sala 910 desta Universidade, na presença da  
Banca Examinadora presidida pelo Professor

RICARDO DE SOUZA MAGINI

e pelos examinadores:

1 - Suzeli Dias

2 - ARISTONE CRISTINE GASEL DA CRUZ

o aluno CHRISTOPHER RAINIER SANTO DA SILVA

apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação intitulado: AUSÊNCIA HISTOLÓGICA DA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA UTILIZANDO MEMBRANAS DE ÁCIDO POLILACTÍCO-GLICÓLICO (PLGA) ASSOCIADO AO NÍO DA HIDROXIAPATITA (PLGA + HA) EM DEFECTOS ÓSSEOS CRÍTICOS.

como requisito curricular indispensável à aprovação na Disciplina de Defesa do TCC e a integralização do Curso de Graduação em Odontologia. A Banca Examinadora, após reunião em sessão reservada, deliberou e decidiu pela APROVAÇÃO do referido Trabalho de Conclusão do Curso, divulgando o resultado formalmente ao aluno e aos demais presentes, e eu, na qualidade de presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais componentes da Banca Examinadora e pelo aluno orientando.

\_\_\_\_\_  
Presidente da Banca Examinadora

Suzeli Dias  
Examinador 1

ARISTONE CRISTINE GASEL DA CRUZ  
Examinador 2

CHRISTOPHER R. S. DA SILVA  
Aluno